

Specific binding substances for antibodies and their use for immunoassays or vaccines

Patent Number: US6210901

Publication date: 2001-04-03

Inventor(s): HOESS EVA (DE); BATZ HANS-GEORG (DE); HERRMANN RUPERT (DE); SEIDEL CHRISTOPH (DE)

Applicant(s):: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (US)

Requested Patent: DE4402756

Application Number: US19960682791 19960731

Priority Number(s): DE19944402756 19940131; WO1995EP00333 19950131

IPC Classification: G01N33/541 ; C07K38/10 ; A61K39/29

EC Classification: C07K1/04, C07K16/08, G01N33/566, G01N33/569K2, G01N33/68K

Equivalents: EP0741869 (WO9520764), B1, B1, ES2145265T, JP9508374T, WO9520764

Abstract

The invention relates to derivatives of hepatitis C virus amino acid sequences. These derivatives can be used to screen samples, such as blood, to determine if antibodies to hepatitis C virus are present

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 44 02 756 A 1

(51) Int. Cl. 6:
C07K 16/00
A 61 K 39/395
G 01 N 33/53

DE 44 02 756 A 1

- (21) Aktenzeichen: P 44 02 756.7
(22) Anmeldetag: 31. 1. 94
(23) Offenlegungstag: 3. 8. 95

(71) Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

(72) Erfinder:

Seidel, Christoph, Dipl.-Chem. Dr., 82362 Weilheim,
DE; Herrmann, Rupert, Dipl.-Chem. Dr., 82362
Weilheim, DE; Hoess, Eva, Dipl.-Chem. Dr., 82319
Starnberg, DE; Batz, Hans-Georg, Dipl.-Chem. Dr.,
82327 Tutzing, DE

(54) Spezifische Bindungssubstanzen für Antikörper und deren Verwendung für Immunoassays oder Vakzine

(55) Gegenstand der Erfindung ist ein immunologisches Bindungssystem für Antikörper und deren Verwendung in Immunoassays und als Vakzin.

Die immunologische Bindungssubstanz, die mit einem Antikörper, der gegen ein Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz spezifisch gerichtet ist, spezifisch bindet und die entweder eine detektierbare Markierung trägt oder festphasengebunden ist oder über ein spezifisches Bindungsmolekül an eine Festphase gebunden werden kann oder an ein immunogen wirksames, T-Zell-Epitop enthaltendes Molekül oder an ein Carrierproteinmolekül gebunden ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische Bindungssubstanz eine dem natürlichen Epitop entsprechende Aminosäuresequenz darstellt, bei der mindestens an einer Peptidbindung oder an einer Aminosäure die Sequenz dadurch verändert ist, daß

C1-C4-Alkylrest darstellen oder einen Phenyl-, Naphtyl- oder ...

a) eine oder mehrere -CO-NH-Peptidbindungsgruppen durch eine davon verschiedene zwei- oder dreiatomige Brücke ersetzt sind,

b) Aminosäureseitenketten um eine -CH₂-Gruppe verkürzt oder um eine -CH₂- , -S-, -O-, -NH-, -SO₂- oder -CO-Gruppe verlängert sind,

c) eine oder mehrere Aminosäuren durch eine nicht-biogene L- oder D-Aminosäure des Typs

HR'N-Y-COOH ersetzt sind, wobei

Y eine -(CH₂)_n-Gruppe darstellt, mit n = 2-8 oder eine >CH-(CH₂)_m-CR¹R²R³-Gruppe darstellt mit m = 0-3,

wobei R¹, R² und R³, die gleich oder verschieden sein können,

Wasserstoff, einen verzweigten oder unverzweigten

DE 44 02 756 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 06.95 508 031/226

Beschreibung

Die Erfindung betrifft spezifische Bindungssubstanzen für Antikörper, deren Verwendung in Immunoassays und als Vakzin sowie ein immunologisches Bestimmungsverfahren unter Verwendung dieser spezifischen Bindungssubstanz als Bindungspartner für den Antikörper.

Von Antikörpern ist bekannt, daß sie die entsprechenden Antigene äußerst spezifisch binden. Ist ein Antikörper gegen eine Aminosäureteilesequenz (Epitop) eines Proteins gerichtet, ist bekannt, daß zu seiner Bindung auch diese Teilsequenz allein verwendet werden kann.

Die spezifische Bindung zweier Biomoleküle wurde erstmals für die Enzymsubstrat-Bindung mit dem Schlußel-Schloß-Prinzip verglichen. Linus Pauling erkannte jedoch in den 60er Jahren, daß zwischen der Enzym-Substrat-Bindung und einer Antikörper-Antigen-Bindung ein fundamentaler Unterschied besteht. Die Bindungsstelle eines Enzyms ist durchaus nicht vollkommen passend für sein Substrat. Vielmehr scheint die Bindungsstelle eines Enzyms der Struktur des Übergangszustands einer Substratreaktion viel ähnlicher zu sein und erlaubt daher dem Substrat einen gewissen Spielraum in seiner Struktur, ohne daß das Enzym seine Bindungseigenschaften für das Substrat verliert. Dagegen wird für die Antigen-Antikörper-Bindung ein absolutes Einfassen des Antigen-Epitops in die Bindungsstelle des Antikörpers gefordert, was eine räumliche Variation des Epitops bezüglich der Antikörperbindung prinzipiell ausschließt. Nur durch diese spezifische Epitop-Antikörper-Bindung kann eine Fremdstoffspezifität aus dem Organismus durch Antikörper eliminiert werden.

Epitope, gegen die ein Antikörper spezifisch gerichtet ist, werden hauptsächlich für zwei Anwendungen eingesetzt: Zum einen dienen sie — meist an einen Carrier gebunden — als Immunogene (Vakzine), die einen Organismus zur Produktion von Antikörpern veranlassen, die gegen diese Epitope oder gegen Antigene, die diese Epitope enthalten, gerichtet sind. Zum anderen werden solche Epitope in Immunoassays zum spezifischen Nachweis von Antikörpern in Körperflüssigkeiten eingesetzt in denen sie durch Antigene, die diese Epitope enthalten, als Immunreaktion erzeugt wurden (beispielsweise nach Infektion durch einen infektiösen Organismus).

Sind die Epitope Polypeptide, so stellt sich bei deren Einsatz im Organismus als Vakzin oder bei diagnostischen Anwendungen im Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Serum das Problem, daß die Polypeptide durch metabolischen Abbau, insbesondere Proteasen, wie sie in Körperflüssigkeiten enthalten sind, zersetzt werden und ihre Funktion verlieren.

Von Polypeptiden, die zu therapeutischen Zwecken, d. h. zur Bindung an Enzyme oder an Hormonrezeptoren im Organismus eingesetzt werden, ist bekannt, daß sie vor ihrem metabolischen Abbau im Körper dadurch geschützt werden können, daß eine Modifikation der Aminosäuresequenz vorgenommen wird. Solche sogenannten Peptidmimetika als therapeutische Mittel und deren Herstellung werden u. a. in Giannis, Angewandte Chemie 105 (1993) 1303–1326; Lee, Bull Chem. Soc. Jpn 66 (1993) 2006–2010 und Dorsch et al, Kontakte (Darmstadt) 1993 (2) beschrieben. Dieser Weg der Modifikation schien aber für Epitope zur Bindung von Antikörpern und zur Erzeugung von Antikörpern als Immunogen aufgrund der bekannten hohen Spezifität der Epitop-Antikörper-Bindung versperrt.

Zur Stabilisierung solcher Polypeptidepitope wurden kürzlich auf dem 3. Europäischen BIACore Symposium in London 1993 Peptid-Humanserumalbumin-Fusionsprodukte vorgeschlagen (Integration of Biocore in the Discovery Department, S. Reboul et al). Durch die Kopplung der Peptidepitope an Humanserumalbumin wird allerdings der enzymatische Abbau der Polypeptide lediglich etwas verzögert, nicht aber verhindert.

Aufgabe der Erfindung war es, Bindungssubstanzen zur Verfügung zu stellen, die als Epitope für Vakzine zur Erzeugung von Antikörpern und in Immunoassays zum Nachweis von Antikörpern, die gegen Epitope einer bestimmten natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet sind, fungieren können und die eine veränderte metabolische Stabilität insbesondere eine veränderte Proteasestabilität oder eine veränderte Wirkungsdauer als Immunogen in einem tierischen Organismus oder als Bindungspartner in Immunoassays mit Körperflüssigkeiten als Probenmaterial aufweisen und die trotzdem einen Antikörper, der gegen ein entsprechendes natürliches Epitop gerichtet ist, in spezifischer und selektiver Weise binden können bzw. diesen Antikörper in einer Immunantwort erzeugen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Erfindung, wie sie in den Ansprüchen charakterisiert ist. Überraschenderweise wurde gefunden, daß trotz der äußerst hohen Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion bei einer Strukturänderung in einer natürlichen Epitop-Polypeptidsequenz durch Veränderung der Aminosäuren in der Sequenz in der erfinderischen Weise nicht die Bindung des modifizierten Epitops zu einem Antikörper, der gegen das unmodifizierte Epitop gerichtet ist, verhindert wird. Gleichzeitig zeigt das modifizierte Epitop im Vergleich zum unmodifizierten Epitop aber veränderte metabolische Eigenschaften im Kontakt mit Körperflüssigkeiten oder in einem tierischen Metabolismus, z. B. eine veränderte Stabilität gegenüber körpereigenen Proteasen.

Unter Veränderung der Aminosäuren der Aminosäuresequenz des natürlichen Epitops werden erfundungsgemäß folgende Möglichkeiten verstanden:

a) Ersatz der —CO—NH-Gruppe mindestens einer Peptidbindung durch eine davon verschiedene zwei- oder drei-atomige Brücke.

Unter zwei-atomiger Brücke wird bevorzugt eine —NH—CO-, —CH₂—CH₂-, —CH=CH-, —CH₂—NH-, —NH—CH₂-, —O—CH₂-, —CH₂—O-, —CH₂—S- oder —S—CH₂-Gruppe verstanden. Unter drei-atomiger Brücke wird bevorzugt eine —CH₂—CH₂—CH₂-Gruppe verstanden, in der eine —CH₂-Gruppe auch durch eine —O- oder —NH-, —S- oder —CO-Gruppe ersetzt sein kann. Bevorzugt sind zwei-atomige Brücken.

Ganz besonders bevorzugt ist eine —CH₂—CH₂-, —CH₂—NH- oder —NH—CO-Gruppe. Wird eine

DE 44 02 756 A1

Peptid-CO-NH-Gruppe beispielsweise durch eine -NH-CO-Gruppe ersetzt, erhält man formal aus zwei Aminosäuren des natürlichen Epitops ein Diamin und eine Dicarbonsäure. Wird eine -CO-NH-Gruppe beispielsweise durch eine -CH₂-CH₂-Gruppe ersetzt, erhält man formal innerhalb der Sequenz der erfundungsgemäßen Bindungssubstanz ein Aminovaleriansäurederivat.

b) Verlängerung oder Verkürzung der Seitenketten einer oder mehrerer Aminosäuren des natürlichen Epitops. Bevorzugt ist dabei der Einbau einer zusätzlichen -CH₂-S-, -O-, -NH-, -SO₂, -CO-Gruppe oder das Weglassen von β-Methylengruppen in der Seitenkette. Ganz besonders bevorzugt wird dies in den vorhandenen Seitenketten aller Aminosäuren des Epitops durchgeführt.

c) Ersatz einer natürlichen Aminosäure des natürlichen Epitops durch eine oder mehrere nicht-biogene L- oder D-Aminosäuren des Typs

5

10

HR'N-Y-COOH

wobei

R' Wasserstoff und

Y eine -(CH₂)_n-Gruppe darstellt, mit n=2-8 oder
eine >CH-(CH₂)_m-CR¹R²R³-Gruppe darstellt mit m=0-3, wobei R¹, R² und R³, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, einen verzweigten oder unverzweigten C1-C4-Alkylrest darstellen oder einen Phenyl-, Naphthyl- oder einen O, S oder N enthaltenden 5-6gliedrigen Heteroarylrest darstellen, der mit Methyl, Halogen, NH₂, OH oder Carboxy substituiert sein kann oder wobei

15

Y eine >CHR-Gruppe darstellt, wobei

R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure darstellt, in der eine -CH₂-Gruppe durch -S-, NH-, -CH=-, -SO₂-, -CO- oder -O- ersetzt ist, oder in der ein oder mehrere H-Atome durch CH₃, NH₂, Carboxyl, SH, Halogen oder Hydroxy ersetzt sind,

wobei in allen Fällen Y eine in keiner natürlichen Aminosäure vorkommende Gruppierung bildet oder

wobei R' Methyl, Ethyl oder Phenyl und

Y eine >CHR-Gruppe darstellt in der R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure ist.

Unter Halogen wird dabei F, Cl, Br oder Jod, insbesondere Cl verstanden. Unter Heteroarylresten sind besonders Pyridin, Pyrrol, Furan und Thiophen bevorzugt.

d) Ersatz von einer oder mehreren L-Aminosäuren durch eine einer beliebigen natürlichen L-Aminosäure entsprechen D-Aminosäure.

20

25

30

35

Die erfundungsgemäße Bindungssubstanz bindet solche Antikörper, die gegen ein Antigen mit einem entsprechenden Epitop aus einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet sind. Insbesondere fallen darunter Antikörper, die gegen ein Epitop eines infektiösen Organismus gerichtet sind. Beispiele sind die Epitope des HCV und des HIV-Virus:

HCV:

Core-Region:

KNKRMTNR and PQDVKFPGGQIVGGV and GQIVGGVYLLPRRGPRLG

40

NS4-Region:

SQHLPYIEQ and QKALGLLQT and SRGNHVSPHYVPESDAA

45

NS5-Region:

SRRFAQALPVWARPQ

50

HIV I:

gp-41:

QLLGIWCGSGKLICITA and RILAVERYLKDDQLLGIWCGSG

55

gp120:

PLGVAPTKAKRRVVQREKR and KRKRRIHIGPGRAFY

HIV II:

60

gp32:

NSWGCAFQVCHTT

65

Außerdem gibt es je nach Typ des Virus leichte Sequenzunterschiede.

Unter Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz wird die Mindestaminosäuresequenz bestehend aus natürlichen Aminosäuren eines natürlichen Antigens, zum Beispiel eines infektiösen Organismus, verstanden, die für die Bindung eines durch das Antigen erzeugten Antikörpers notwendig ist. Dies sind Aminosäuresequenzen aus mindestens 6 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 10 Aminosäuren. Selbstverständlich können sich an die Epitopaminosäuresequenz am C- oder N-terminalen Ende weitere Aminosäuren anschließen. Diese tragen aber nicht mehr essentiell zur Bindung des Antikörpers bei. Die erfundungsgemäße immunologische Bindungssubstanz soll mindestens dieser Aminosäuresequenz des natürlichen Epitops entsprechen, wobei sie allerdings innerhalb dieser Aminosäuresequenz mindestens an einer Stelle in der erfundungsgemäßen Weise verändert ist.

Bevorzugt wird eine —CO—NH-Gruppe einer Peptidbindung erfundungsgemäß ersetzt, ganz besonders bevorzugt an einer Stelle der Sequenz an der die zugehörige Amidbindung durch eine Protease besonders spaltungsgefährdet ist. Dabei muß nicht an jeder möglichen Proteasespaltstelle eine —CO—NH-Gruppe durch eine hydrolysestabile Atomgruppe modifiziert werden. Dem Fachmann sind die Konzentrationen und Arten relevanter Proteasen in verschiedenen Körperflüssigkeiten bekannt. Häufig vorkommende Proteasen sind beispielsweise Trypsin, Chymotrypsin, Collagenase, Elastase, Thrombin, Plasmin oder Kallikrein (z. B. N. Katunuma et al., Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer Verlag Berlin, Seite 37—44 (1983). Ebenso sind ihm die jeweiligen Aminosäuresequenzen der Spaltstellen verschiedener Proteasen bekannt. Daneben gibt es auch unspezifische Proteasen. Besonders spaltungsgefährdet sind beispielsweise Proteasespaltstellen an den Enden einer Aminosäuresequenz. Hier ist die Aminosäuresequenz besonders gefährdet durch den Abbau durch Exopeptidasen. Weiter sind Glycin enthaltende Peptidsequenzen besonders spaltungsgefährdet, da die fehlende Seitengruppe des Glycins einen hydrolytischen Angriff einer unspezifischen Protease besonders begünstigt. Durch die erfundungsgemäße Modifikation einer durch Peptidasen gefährdeten Amidbindung, insbesondere einer Glycin-Peptid-Bindung allein, kann schon eine wesentlich verbesserte Stabilität der erfundungsgemäßen Bindungssubstanzen gegenüber den natürlichen Epitopen bezüglich Abbau durch Proteasen erreicht werden.

Die Proteasestabilität einer erfundungsgemäßen Bindungssubstanz kann vorteilhaft beispielsweise so ermittelt werden, daß sie Pankreatin, einem Gemisch häufig vorkommender Proteasen (u. a. Carboxypeptidase A und B, Trypsin, Pepsin, Chymotrypsin, Elastase) oder Pronase (u. a. Aminopeptidase, Carboxypeptidase, alkalische und neutrale Proteinase), ausgesetzt wird. Der verminderte enzymatische Abbau der Bindungssubstanz kann durch HPLC-Analyse des zeitlichen Auftretens von Peptidbruchstücken bestimmt werden.

Ganz besonders bevorzugt wird eine —CO—NH-Gruppe durch —CH₂—CH₂—, CH₂—NH- oder NH—CO-Gruppen ersetzt.

Eine zusätzliche Blockierung der Sequenz-Termini stabilisiert die Bindungssubstanz zusätzlich gegenüber Exopeptidasen.

Die immunologische Bindungssubstanz ist entweder an ein detektierbares Markierungsmolekül, an eine Festphase oder an ein spezifisches Bindungsmolekül, das an eine Festphase spezifisch binden kann, gekoppelt. Diese Kopplung erfolgt bevorzugt kovalent, entweder direkt über das C- oder N-terminale Ende der Bindungs- substanz oder über einen Spacer.

Eine detektierbare Markierung kann direkt oder indirekt ein meßbares Signal liefern, zum Beispiel durch Radioaktivität, Chemilumineszenz, Phosphoreszenz, Fluoreszenz oder Elektrochemilumineszenz oder durch sichtbare Farbe. Ein indirekt meßbares Signal liegt zum Beispiel bei Enzymmarkierung vor. Hier wird durch Zugabe eines Enzymsubstrates eine Farbe gebildet. Beispiele für Enzymmarkierungen sind: Markierungen mit β-Galaktosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase.

Die Bindung der Bindungssubstanz an eine Festphase erfolgt nach dem Fachmann geläufigen Methoden. Als Festphasen dienen beispielsweise Kugeln, Kunststoffröhren, Mikrotiterplatten oder Testträger.

Die immunologische Bindungssubstanz kann auch an ein spezifisches Bindemolekül gekoppelt sein, über das es an eine Festphase binden kann. Ein bevorzugtes Beispiel ist Biotin, das bevorzugt am N-terminalen Ende der Bindungssubstanz gebunden ist und spezifisch an eine mit Streptavidin beschichtete Oberfläche binden kann.

Die erfundungsgemäße Bindungssubstanz kann vorteilhaft in Immunoassays eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist ihr Einsatz in Immunoassays nach dem Sandwichprinzip zum Nachweis eines Antikörpers, der gegen ein Epitop mit einer entsprechenden, natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet ist, durch Inkubation der Antikörperprobe mit zwei Bindungspartnern, die mit dem Antikörper spezifisch binden, und Bestimmung der Bildung des Antikörper-Bindungspartner-Komplexes in einer geeigneten Weise, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Bindungspartner eine erfundungsgemäße Bindungssubstanz darstellt.

Bevorzugt wird ein solcher Immunoassay als heterogener Immunoassay durchgeführt. Dabei ist einer der Bindungspartner entweder direkt oder über einen Spacer an eine Festphase gebunden oder ist an eine spezifische Bindungsstelle, zum Beispiel Biotin, gebunden, die während des Immunoassays an die Festphase binden kann. Für diesen Bindungspartner wird eine erfundungsgemäße Bindungssubstanz verwendet.

Der zweite Bindungspartner ist markiert. Für diesen Bindungspartner kann entweder eine erfundungsgemäße, mit einem Markierungsmolekül versehene Bindungssubstanz oder ein gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichteter, markierter Anti-Antikörper benutzt werden. Bevorzugte Markierungen sind Enzymmarkierungen oder Direktmarkierungen mit beispielsweise Metallsolen.

Zur Durchführung des Immunoassays wird eine Probe des nachzuweisenden Antikörpers mit dem ersten Bindungspartner, dem markierten Bindungspartner und der Festphase gleichzeitig oder sukzessive inkubiert, wobei sich ein festphasengebundener Komplex aus erstem Bindungspartner, Antikörper und markiertem Bindungspartner bildet. Bevorzugt werden dann nichtgebundene, markierte Bindungspartner in der flüssigen Phase von an der Festphase gebundenen, markierten Bindungspartnern getrennt und die Markierung in einer der beiden Phasen als Maß für die Anwesenheit oder Konzentration des nachzuweisenden Antikörpers gemessen. Bei Enzymmarkierungen beispielsweise wird zur Messung die Enzymsubstratlösung dazugegeben. Die Messung kann beispielsweise visuell oder photometrisch erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Immunogen bzw. ein Vakzin enthaltend eine erfundungsgemäße Bindungssubstanz, die an eine Aminosäuresequenz, die ein T-Zell-Epitop enthält, oder an ein Carrier-Molekül gekoppelt ist.

Das Vakzin dient zur vorbeugenden Behandlung von Infektionen, die durch Antigene hervorgerufen werden, die ein Epitop der jeweiligen natürlichen Aminosäuresequenz enthalten. Zum Einsatz als Immunogen muß die erfundungsgemäße Bindungssubstanz am C- oder N-terminalen Ende entweder an ein geeignetes hochmolekulares Trägerprotein, wie zum Beispiel Keyhole limpet hemocyanine, Hemocyanine, Kinderserumalbumin oder Edestin gebunden werden. Die Kopplung kann zum Beispiel am N-terminalen Ende der Aminosäuresequenz über Maleimidohexansäure-N-Hydroxysuccinimidester erfolgen. Da im allgemeinen Vakzine (Immunogene) auch T- oder B-Zell-Epitope sind, die peptidischer Natur sein können, kann die erfundungsgemäße Bindungssubstanz auch an eine Aminosäuresequenz gekoppelt werden, die T-Zell-Epitope enthält.

Das Vakzin liegt in einer pharmakologisch effektiven Dosis und einer pharmazeutisch akzeptablen Formulierung vor.

Obwohl in einer Immunantwort Antikörper gegen ein künstliches Epitop mit einer vom natürlichen Epitop unterschiedlichen Aminosäurestruktur erzeugt werden, binden diese Antikörper auch an das natürliche Epitop und können so zur Immunabwehr gegen Antigene, die dieses Epitop enthalten, verwendet werden. Aufgrund der Veränderung in der Sequenz zeigen sie aber ein verändertes Verhalten in Bezug zu ihrem Metabolismus im tierischen Organismus, z. B. eine veränderte Proteasesstabilität.

Mit dem erfundungsgemäßen Immunogen ist es auch möglich, durch geläufige Verfahren der Immunisierung Antikörper zu erhalten, mit denen Antigene, die die Aminosäuresequenz der natürlichen Epitope enthalten, in einem immunologischen Bestimmungsverfahren nachgewiesen werden können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfahrung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die gegen ein Epitop einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet sind, das dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugertier mit einer entsprechenden erfundungsgemäßen Bindungssubstanz, das mit einem Molekül verbunden ist, das ein T-Zell-Epitop enthält, z. B. ein Carrierproteinmolekül, immunisiert wird und die erzeugten Antikörper nach bekannten Verfahren, z. B. aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.

Die Herstellung der erfundungsgemäßen Bindungssubstanz ist nach den dem Fachmann geläufigen Methoden zur Peptidsynthese möglich (z. B. Merrifield, JACS 85 (1964), 2146). Ein weiterer Gegenstand der Erfahrung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung der erfundungsgemäßen Bindungssubstanzen welches darin besteht, daß die das C-terminalen Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende die gewünschte Aminosäuresequenz schrittweise aufgebaut wird, diese anschließend vom Träger abgespalten wird und vor oder nach der Abspaltung vom Träger an ein Markierungsmolekül, an ein spezifisches Festphasen-Bindemolekül, an eine Festphase oder an ein Carriermolekül gekoppelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß für die Peptidsynthese an der Stelle mindestens einer Peptidbindung der natürlichen Epitopsequenz statt der nacheinander diese Peptidbindung aufbauenden ersten Aminosäure NH₂-CHR¹-COOH und zweiten Aminosäure NH₂-CHR²-COOH eine nichtnatürliche Aminosäure NH₂-CHR¹-X-CHR²-COOH verwendet wird, in der R¹ und R², die gleich oder verschieden sein können, Seitenketten von natürlichen Aminosäuren bilden und X eine proteasestabile Atomgruppierung, insbesondere eine zwei- bis dreiatomige Kette wie eine -NH-CO-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -NH-CH₂-, CH₂-NH-, CH₂-O-, O-CH₂-, CH₂-S-, -S-CH₂ oder -CH₂-CH₂-CH₂-Gruppe darstellt.

Ist die Modifikation die Veränderung einer Aminosäureseitenkette oder der Ersatz einer natürlichen Aminosäure des natürlichen Epitops durch eine künstliche, nicht natürliche Aminosäure, so ist das erfundungsgemäße Herstellverfahren dadurch gekennzeichnet, daß statt der zum Epitop gehörenden natürlichen Aminosäure eine entsprechend modifizierte Aminosäure benutzt wird. Diese künstlichen Aminosäuren sind teilweise käuflich erhältlich oder können nach dem Fachmann bekannten Methoden synthetisiert werden, (z. B. L. Gazerro et al, Solid phase synthesis, Seite 403, 1990; G. Jung, Peptides 1988, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1989, Seite 646-648; A. Jäger, Peptides 1992, Escom Science Publisher B.V. 1993, Seite 47-49; R. Varrel, Peptides 1990, Escom Science Publishers B.V. 1991, Seite 642-664, Seite 393-394, Seite 385-386, Seite 370-371).

Im einzelnen wird zur Synthese der Aminosäuresequenz eine Aminosäure des C-terminalen Ende über ihre Carboxygruppe an ein unlösliches, leicht filtrierbares Polymer geknüpft, und dann vom C-terminalen Ende her die Peptidkette schrittweise aufgebaut. Zu diesem Zweck wird eine N-geschützte Aminosäure mit einer reaktiven Gruppierung des Polymeres zur Reaktion gebracht. Von der am Trägermaterial kovalent verankerten Aminosäure wird die N- α -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Von dem am Träger kovalent gebundenen Dipeptid wird die N- α -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Alle überschüssigen Reagenzien und Beiprodukte werden durch einfaches Filtrieren entfernt. Ist die gewünschte modifizierte Peptidsequenz auf diese Weise hergestellt, wird die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung des polymeren Trägers gespalten. Der unlösliche Träger wird durch einfache Filtration von dem in Lösung befindlichen Peptid entfernt. Das Peptid wird mittels chromatographischer Methoden gereinigt. Die Kopplung des Peptids an eine Festphase, an ein Carriermolekül, an eine spezifische Festphasen-Bindungsstelle oder an eine Markierung erfolgt nach bekannten Methoden, bevorzugt am N-terminalen Ende der Peptidsequenz. Eine Biotinylierung kann beispielsweise nach PNAS USA 80, 1983, 4045 erfolgen. Ein bevorzugtes Biotinylierungsmittel ist Biotinylaminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester. Diese Gruppen können auch schon am N-Terminus der modifizierten Aminosäuresequenz am Ende der Festphasensynthese eingeführt werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Beispiel 1

Durchführung eines Immunoassays mit erfindungsgemäßen biotinylierten Bindungssubstanzen gegen Antikörper gerichtet gegen das core-Epitop des HCV-Virus.

5 In den eingesetzten Bindungssubstanzen wurde gegenüber dem natürlichen Epitop "core 2m" ine oder mehrere CO—NH-Peptidbindungsgruppen erfindungsgemäß ersetzt (core2m I — core2m VII) oder Aminosäuren durch D-Aminosäuren ersetzt (core 2m VII).

In streptavidinbeschichteten ES 22 Tubes der Firma Boehringer Mannheim werden jeweils 20 µl Serum vorgelegt (Negativserum, Positivserum, positive Seren A—C). Dann wird 1000 µl Peptidlösung (core 2m bzw. 10 core 2m I—VII, Konzentration 100 ng/ml in Kaliumphosphatpuffer 40 mmol/l, pH 7,0) zupipettiert und 60 min im ES 22-Gerät der Firma Boehringer Mannheim stehengelassen. Nach 60 min Inkubation wird die Peptid/Serumlösung herauspipettiert und die Tubes mit Testwaschlösung Kaliumphosphatpuffer 40 mmol/l, pH 7,0 gewaschen. Dann wird 1000 µl Peroxidasekonjugatlösung (Peroxidase konjugiert an einen Anti FcY-Antikörper, 0,5 U/ml) zupipettiert und wieder 60 min inkubiert. Die Konjugatlösung wird abpipettiert und das Tube mit Waschlösung gewaschen. Dann wird 1000 µl ABTS-Lösung (1,9 mmol/l) zupipettiert und wieder 60 min inkubiert. Nach 60 min Inkubation wird die Lösung aus dem Tube in ein Photometer pipettiert und bei 405 nm gemessen. Tabelle 1 zeigt die relativen Reaktivitäten der künstlichen Epitope core2m I—VI im Vergleich zum natürlichen Epitop (core 2m). Die Reaktivitäten ergeben sich aus dem Messergebnis des Immunoassay in Bezug zu einer Standardkurve. Trotz der Modifikation binden die künstlichen Epitope spezifisch und selektiv (zum Beispiel core 2m I).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Peptid	Sequenz	HPLC-RT	HPLC-Integral	rel. Konzentration	Einsatzpos.	Kontrolle	Serum A	Serum B	Serum C
core2m	Bi-XUZUPQDVKFPGGQIVGGV	38.264	3001014,	100,	relative Reaktivität:				
core2m VI	Bi-XUZUPQDVKFp4 V	43.818	483511,	15,	0.360	0.207	0.170	0.140	0.140
core2m V-	Bi-XUZUPQDVKFp5 QIVGGV	39.742	773020,	26,	0.360	0.160	0.130	0.130	0.130
core2m IV	Bi-XUZUPQDVKFp4 QIVGGV	42.821	1231484,	41,	0.370	0.260	0.210	0.232	0.232
core2m III	Bi-XUZUPQDVKFp1 GAIVGGV	39.033	1512285,	50,	0.768	0.478	0.653	0.653	0.653
core2m II	Bi-XUZUPQDVKFpG1 QIVGGV	38.571	1762031,	59,	0.680	0.308	0.647	0.647	0.647
core2m I	Bi-XUZUPQDVKFpGGGm1 V	38.822	1162808,	39,	1.140	0.621	0.859	0.859	0.859
core2m VII	Bi-XUZUPQDVKFpGGGm1 V	39.098	634497,	22,	1.260	0.809	1.010	1.010	1.010

E= Aminoisobutyrylenglykol

4= Aminooktandursäure

U= D-Ala

1= Aminoisobutyrsäure

2= γ -Aminobuttersäure

3= Aminovaleriansäure

p=D-Prolin

g=D-Alanin

Relative Reaktivität:

Die relative Einsatzkonzentration der Peptidantigene I - VI ergab sich aus deren HPLC-Integral.

Die Reaktivität der Antigene I - VI wurde relativ zum Referenzantigen Core2m gleicher Konzentration ermittelt.

Beispiel 2

Versuchsdurchführung für core2m-Verdau mit Pankreatin

Es wurden zuerst core2m-Lösungen mit einem ungefährem $c = 1-3 \text{ mg/ml}$ in dest. Wasser hergestellt. Diese Lösungen wurden in die anal. HPLC eingespritzt (Injektionsvolumen = $40 \mu\text{l}$). Die Lösungen wurden nun so verdünnt, das bei erneutem Einspritzen in die HPLC die Fläche 400 000 betragen

DE 44 02 756 A1

müßte. Z.B. Fläche der core2m IV-Lösung ergab 600 000 auf der anal. HPLC bei 40 µl Injektionsvolumen.

Nun werden zwei Teile dieser Lösung mit einem Teil dest. Wasser verdünnt.

Jeweils 200 µl dieser eingestellten core2m-Lösungen wurden mit 50 µl Pankreatin-Lösung (c = 1 mg/ml) versetzt.

5 Von diesen Lösungen wurde nach 55 min und nach 125 min eine Probe in die anal. HPLC eingespritzt.

Als Referenz wurde von jeder core2m-Lösung eine 200 µl-Probe mit 50 µl dest. Wasser versetzt und in die anal. HPLC eingespritzt.

Über die Flächen des Peptidpeaks der anal. HPLC kann man den prozentualen Abbau des jeweiligen Peptids bestimmen.

10 Tabelle 2 gibt den prozentualen Anteil in % d der Resistenz der einzelnen Epitopsequenzen gegenüber Proteaseabbau nach 55 min und 125 mm an. Während das natürliche Epitop "core 2m" vollständig abgebaut wird (0% Resistenz) sind die künstlichen Epitope core 2m I — VII wesentlich proteasestabilier.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 2

HCV Core2m-Belastung mit Pankreatitis

Core2m -Lösungen mit HPLC-Areals auf 400000 in 40 µl Injektionsprobe eingesetzt.
Pankreatin-Lösung 51 mg/ml in H2O

Probe	Sequenz	Area vorher	%	Area nach 55 min	%	Area nach 125 min	%
core 2m	B-XUZUPQDVKFPGQQGV	3183895	100	0	0	0	0
core 2m I	B-XUZUPQDVKFPGQQGV	3240090	100	3252704	100	2460332	76
core 2m II	B-XUZUPQDVKFPG1 QIVGV	3114243	100	5617142	18	1106890	4
core 2m III	B-XUZUPQDVKFPI GQIVGGV	3265196	100	657676	20	135624	4
core 2m IV	B-XUZUPQDVKFPI GQIVGGV	3415398	100	3057959	90	2715127	10
core 2m V	B-XUZUPQDVKFPI GQIVGGV	2892631	100	2142892	72	765526	26
core 2m VI	B-XUZUPQDVKFPI GQIVGV	3883701	100	2551154	69	1453596	39
core 2m VII	B-XUZUPQDVKFPGGQIVGV	2629847	100	1147834	44	431577	18

Beispiel 3

Synthese des serumstabilen HCV-Antigens core2m I

5 Das Antigen wurde mittels Fmoc-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-Festphasenpeptidsynthese mit einem SMPS
 350 Peptidsynthesizer der Fa. Zinsser Analytics an 15 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phe-
 noxy-Ha SA-5030 der Fa. Advanced Chemtech mit einer Beladung von 0.52 mmol/g hergestellt. Von folgenden
 N-Fmoc-Aminosäure Derivaten wurden nacheinander zweimal je 90 µmol zusammen mit je 90 µmol 1-Hy-
 droxybenzotriazol in 270 µl Dimethylformamid und 105 µmol einer Dimethylformamidlösung von 90 µmol
 10 N,N-Diisopropylcarbodiimid an das aufzubauende festphasengebundene Peptid angekoppelt: Valin, δ-Amino-
 valeriansäure, Valin, Glycin, Glycin, Prolin, Phenylalanin, Lysin (tert. Butyloxycarbonyl), Asparaginsäure
 15 (tert. Butylester), Glutamin (Trityl), Prolin, β-Alanin, ε-Aminocapronsäure, β-Alanin, tert. Butyloxycarbonyl-Ly-
 sin, Dimethoxytryptylbiotin. Die Kupplungszeiten betragen 40 und 50 Minuten. Die Abspaltungszeit der Fmoc-
 Schutzgruppe erfolgt nach jeder Doppelkupplung mit 600 µl einer 50%igen Lösung von Piperidin in Dimethyl-
 formamid. Die Abspaltzeit beträgt 20 Minuten. Die Waschschritte werden mit jeweils 700 µl Dimethylformamid
 15 achtmal nach jedem der Reaktionsschritte durchgeführt. Die Freisetzung des Peptids erfolgt durch Behandlung
 des vom Lösungsmittel filtrierten Harzes mit je 750 µl einer Mischung aus 90% Trifluoressigsäure, 3% Thioani-
 sol, 3% Ethandithiol und 3% Thiokresol innerhalb von 20 Minuten und anschließend 140 Minuten. Das Produkt
 20 wird durch Zugabe von 15 ml kaltem Diisopropylether zu vereinigten Filtrat ausgefällt und durch Filtration
 isoliert. Der Rückstand wird in 3 ml 50%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Der Lyophilisationsvorgang
 wird zweimal wiederholt. Es werden 17 mg Rohmaterial einer Reinheit von 94% laut reverse phase HPLC
 erhalten (LSIMS: M-H⁺; Matrix: mNBA, Beschleunigungsspannung: 6 kV).

Beispiel 4

25 Synthese eines tetrameren HCV-Vakzinbestandteils mit erhöhter Resistenz gegen Proteasen:
 Das Vakzin besteht aus einem B-Zell Epitop des HCV-Antigens (HCV core 18-33) gekoppelt an ein T-Zell-Epi-
 top aus einem Ebstein-Barr-Virus (EBV LMP 43-53), wobei in beiden Epitopen eine Glycin-Glycin-Peptidbin-
 dung des natürlichen Epitops durch eine -CH₂-CH₂-Gruppe ersetzt ist (entspricht dem Einbau einer δ-Ami-
 30 novalerian-Säure).

Die synthetische Vaccine wurde mittels Fmoc-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-Festphasenpeptidsynthese mit
 einem SMPS 350 Peptidsynthesizer der Fa. Zinsser Analytics an 15 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy-Harz SA-5030 der Fa. Advanced Chemtech mit einer Beladung von 0.22 mmol/g hergestellt.
 Von folgenden N-Fmoc-Aminosäure-Derivaten wurden nacheinander zweimal je 90 µmol zusammen mit je
 35 90 µmol 1-Hydroxybenzotriazol in 270 µl Dimethylformamid und 105 µmol einer Dimethylformamidlösung von
 90 µmol N,N-Diisopropylcarbodiimid an das aufzubauende festphasengebundene Peptid angekoppelt: Ne-
 Fmoc-Lysin, Ne-Fmoc-Lysin, β-Alanin, β-Alanin, Leucin, Leucin, Alanin, δ-Aminovaleriansäure, Threonin (-tert-
 40 Butylester), Tryptophan, Asparaginsäure (tert. Butylester), Serin (tert. Butylester), Methionin, Valin, Valin,
 δ-Aminovaleriansäure, Valin, Isoleucin, Glutamin (Trityl), Glycin, δ-Aminovaleriansäure, Prolin, Phenylalanin,
 Lysin (tert. Butyloxycarbonyl), Valin, Asparaginsäure (tert. Butylester), Glutamin (Trityl), Prolin, Essigsäure. Die
 Kupplungszeiten betragen 40 und 50 Minuten. Die Abspaltungszeit der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt nach jeder
 45 Doppelkupplung mit 600 µl einer 50%igen Lösung von Piperidin in Dimethylformamid. Die Abspaltzeit beträgt
 20 Minuten. Die Waschschritte werden mit jeweils 700 µl Dimethylformamid achtmal nach jedem der Reaktions-
 schritte durchgeführt. Die Freisetzung des Peptids erfolgt durch Behandlung des vom Lösungsmittel filtrierten
 50 Harzes mit je 750 µl einer Mischung aus 90% Trifluoressigsäure, 3% Thioanisol, 3% Ethandithiol und 3%
 Thiokresol innerhalb von 20 Minuten und anschließend 140 Minuten. Das Produkt wird durch Zugabe von 15 ml
 kaltem Diisopropylether zu vereinigten Filtrat ausgefällt und durch Filtration isoliert. Der Rückstand wird in
 3 ml 50%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Der Lyophilisationsvorgang wird zweimal wiederholt. Es
 werden 13 mg Rohmaterial einer Reinheit von 42% laut reverse phase HPLC erhalten, wovon 4 mg mittels
 präparativer reverse-phase-HPLC gereinigt werden. Ausbeute: 0.7 mg (LSIMS: M-H⁺; Matrix: mNBA, Be-
 schleunigungsspannung: 6 kV).

Patentansprüche

- 55 1. Immunologische Bindungssubstanz, die an einen Antikörper, der gegen ein Epitop mit einer natürlichen
 Aminosäuresequenz spezifisch gerichtet ist, spezifisch bindet und die entweder eine detektierbare Markie-
 rung trägt oder festphasengebunden ist oder über ein spezifisches Bindungsmolekül an eine Festphase
 gebunden werden kann oder an ein immunogen wirksames, T-Zell-Epitop enthaltendes Molekül oder an ein
 60 Carrierproteinmolekül gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische Bindungssubstanz eine
 dem natürlichen Epitop entsprechende Aminosäuresequenz darstellt, bei der mindestens an einer Peptid-
 bindung oder an einer Aminosäure die Sequenz dadurch verändert ist, daß
 a) eine oder mehrere -CO-NH-Peptidbindungsgruppen durch eine davon verschiedene zwei- oder
 dreiatomige Brücke ersetzt sind,
 b) Aminosäureseitenketten um eine -CH₂-Gruppe verkürzt oder um eine -CH₂-, -S-, -O-, -NH-,
 65 -SO₂- oder -CO-Gruppe verlängert sind,
 c) eine oder mehrere Aminosäuren durch eine nicht-biogene L- oder D-Aminosäure des Typs HR'
 N-Y-COOH ersetzt sind, wobei
 R' Wasserstoff und

DE 44 02 756 A1

- Y eine $-(CH_2)_n$ -Gruppe darstellt, mit $n = 2-8$ oder eine $>CH-(CH_2)_m-CR^1R^2R^3$ Gruppe darstellt mit $m=0-3$, wobei
- R¹, R² und R³, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, einen verzweigten oder unverzweigten C1-C4-Alkylrest darstellen oder einen Phenyl-, Naphtyl- oder einen O, S oder N enthaltenden 5-6gliedrigen Heteroarylrest darstellen, der mit Methyl, Halogen, NH₂, OH oder Carboxy substituiert sein kann oder wobei
- Y eine $>CHR$ -Gruppe darstellt, wobei
- R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure darstellt, in der eine -CH₂-Gruppe durch -S-, NH-, -CH=-, -SO₂-, -CO- oder -O- ersetzt ist, oder in der ein oder mehrere H-Atome durch Methyl, NH₂, Carboxyl, SH, Halogen oder Hydroxy ersetzt sind wobei in allen Fällen Y eine in keiner natürlichen Aminosäure vorkommenden Gruppierung bildet oder wobei R' Methyl, Ethyl oder Phenyl und Y eine $>CHR$ -Gruppe darstellt, in der R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure ist, oder
- d) eine oder mehrere Aminosäuren durch eine einer natürlichen L-Aminosäure entsprechenden D-Aminosäure ersetzt sind.
2. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die -CO-NH-Gruppe einer Peptidbindung durch eine -NH-CO-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -CH₂-NH-, -NH-CH₂-, -S-CH₂-, -CH₂-S-, -CH₂-O-, -O-CH₂ oder -CH₂-CH₂-CH₂-Gruppe ersetzt ist.
3. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die -CO-NH-Gruppe durch eine -CH₂-CH₂, CH₂-NH-, -NH-CO-Gruppe ersetzt ist.
4. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß eine -NH-CO-Gruppe an einer proteasespaltungsgefährdeten Peptidbindung ersetzt ist.
5. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die -CO-NH-Gruppe zwischen zwei Aminosäuren, von denen mindestens eine Glycin ist, ersetzt ist.
6. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Aminosäureseitenketten um eine -CH₂-Gruppe verlängert sind.
7. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Aminosäure durch eine D-Aminosäure wie D-Prolin oder D-Alanin ersetzt ist.
8. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstanz an ein spezifisches Bindungsmolekül für eine Festphasenbindungsstelle gebunden ist.
9. Immunologische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das spezifische Bindungsmolekül Biotin ist.
10. Vakzin enthaltend als Immunogen eine immunologische Bindungssubstanz, die an ein Carrier-Molekül oder ein immunogen wirksames Molekül, das ein T-Zell-Epitop enthält, gekoppelt ist, wobei die Bindungsstanz mit einem Antikörper, der gegen ein Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet ist, spezifisch bindet und zusammen mit dem Carrier-Molekül fähig ist, solche Antikörper als Immunantwort zu erzeugen, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungssubstanz eine an einen immunogen wirksamen Carrier gebundene Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-9 ist.
11. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die gegen ein Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Immunogen gemäß Anspruch 10 immunisiert wird und Antikörper nach üblichen Methoden gewonnen werden.
12. Immunoassay zum Nachweis eines Antikörpers, der gegen ein Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet ist, durch Inkubation der Antikörperprobe mit zwei Bindungspartnern, die mit dem Antikörper spezifisch binden, und Bestimmung der Bildung des Antikörper-Bindungspartner-Komplexes in geeigneter Weise, dadurch gekennzeichnet, daß als Bindungspartner für den Antikörper mindestens eine Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-9 verwendet wird.
13. Immunologisches Bestimmungsverfahren zum Nachweis eines Antikörpers, der gegen ein Epitop mit einer natürlichen Aminosäuresequenz gerichtet ist, mit Hilfe einer ersten Bindungssubstanz, die festphasen gebunden vorliegt oder über ein spezifisches Bindungsmolekül an eine Festphase gebunden werden kann und die spezifisch mit dem Antikörper bindet, und einem markierten Bindungspartner, der mit dem Antikörper spezifisch bindet, durch Kontaktieren der Antikörperprobe mit der spezifischen Bindungssubstanz, dem markierten Bindungspartner und der Festphase und Messung der Markierung an der Festphase oder in freier Phase als Maß für die Menge des Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische Bindungssubstanz eine Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-9 darstellt.
14. Immunologisches Bestimmungsverfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß auch der markierte Bindungspartner eine markierte spezifische Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-9 darstellt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der markierte Bindungspartner ein gegen den Antikörper gerichteter Anti-Antikörper darstellt.
16. Verfahren gemäß Anspruch 3-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspartner enzymmarkiert ist oder markiert Chemiluminszenz oder Fluoreszenz.
17. Verwendung einer spezifischen Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1-9 für Immunoassays.
18. Verwendung einer spezifischen Bindungssubstanz gemäß Anspruch 10 zur Herstellung eines Vakzins.
19. Herstellung einer spezifischen Bindungssubstanz gemäß Anspruch 1 durch Bindung der das C-terminale Ende bildenden Aminosäure an einen Träger, schrittweisen Aufbau der Aminosäuresequenz nach bekannten Methoden, Abspaltung des C-terminalen Endes der Sequenz vom Träger und Kopplung der Sequenz vor oder nach der Abspaltung vom Träger an ein Markierungsmolekül, an ein spezifisches Festphasenbindmolekül, an eine Festphase, an ein Carriermolekül oder an ein T-Zell-Epitop enthaltendes Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß für die Peptidsynthese an der Stelle einer proteasespaltungsgefährdeten

Peptidbindung oder einer Aminosäure der natürlichen Epitopsequenz statt

- 5 a) der nacheinander diese Peptidbindung bildenden Aminosäuren $\text{NH}_2-\text{CHR}^1-\text{COOH}$ und $\text{NH}_2-\text{CHR}^2-\text{COOH}$ eine nichtnatürliche Aminosäure $\text{NH}_2-\text{CHR}^1-\text{X}-\text{CHR}^2-\text{COOH}$ verwendet wird, in der R¹ und R², die gleich oder verschieden sein können, Seitenketten von natürlichen Amino-
- b) einer Aminosäure des natürlichen Epitops

— eine Aminosäure verwendet wird, deren Seitenkette um eine —CH₂-Gruppe verkürzt oder um eine —CH₂-, —S-, —O-, —NH-, —SO₂- oder —CO-Gruppe verlängert ist

10 — eine nicht-biogene L- oder D-Aminosäure des Typs HR' N—Y—COOH verwendet wird, in der R' Wasserstoff und

Y eine —(CH₂)_n-Gruppe darstellt, mit n=2—8 oder eine >CH—(CH₂)_m—CR¹R²R³-Gruppe darstellt mit m=0—3, wobei

15 R₁, R₂ und R₃, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, einen verzweigten oder unverzweigten C₁—C₄-Alkylrest darstellen oder einen Phenyl-, Naphtyl- oder einen O, S oder N enthaltenden 5-6gliedrigen Heteroarylrest darstellen, der mit Methyl, Halogen, NH₂, OH oder Carboxy substituiert sein kann oder wobei

Y eine >CHR-Gruppe darstellt, wobei

20 R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure darstellt, in der eine —CH₂-Gruppe durch —S—, NH—, —CH=—, —SO₂—, —CO— oder —O— ersetzt ist, oder in der ein oder mehrere H-Atome durch CH₃, NH₂, Carboxyl, SH, Halogen oder Hydroxy ersetzt sind wobei in allen Fällen Y eine in keiner natürlichen Aminosäure vorkommende Gruppierung bildet oder wobei R' Methyl, Ethyl oder Phenyl und Y eine >CHR-Gruppe darstellt, in der R eine Seitenkette einer natürlichen Aminosäure ist, oder

25 — eine D-Aminosäure verwendet wird, die einer beliebigen natürlichen L-Aminosäure entspricht.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

